

Efektivitas Probiotik *Lactobacillus plantarum* 2C12 dan *Lactobacillus acidophilus* 2B4 Sebagai Pencegah Diare pada Tikus Percobaan

The Effectivities of Probiotic *Lactobacillus plantarum* 2C12 and *Lactobacillus acidophilus* 2B4 as Antidiarrhea on Rats

I. I. Arief^a, B. Sri Laksmi Jenie^b, M. Astawan^b, & A. B. Witarto^c

^aDepartemen Ilmu Produksi dan Teknologi Peternakan, Fakultas Peternakan, Institut Pertanian Bogor
Jln. Agatis, Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680

^bDepartemen Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor

^cPusat Penelitian Bioteknologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia

Jln. Raya Bogor Km. 46 Cibinong 16911
(Diterima 05-05-2010; disetujui 03-09-2010)

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effectiveness of probiotics *Lactobacillus plantarum* 2C12 and *Lactobacillus acidophilus* 2B4 to prevent diarrhea caused by enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC). Albino rats (*Rattus norvegicus*) were daily orally administered by 10^8 cfu/ml of both probiotics without or simultaneously infected with EPEC (10^8 cfu/ml) for 7 days. Negative control was not infected by probiotic and EPEC while positive control was challenged with EPEC alone. After 1, 2 and 3 weeks, total of lactic acid bacteria (LAB) and *E. coli* of mucosa of cecum and cecum content were evaluated. It was observed that rats administered by *L. plantarum* 2C12 and *L. acidophilus* 2B4 and challenged with EPEC had better performances when compared with the positive control for daily weight gain, feed consumption, feed efficiency rate. Diarrhea was determined by total of *E. coli* on cecum and watery fecal. Both probiotics could increase $1 \log_{10}$ cfu/cm² of total LAB on mucosa of cecum and also $1 \log_{10}$ cfu/g of cecum content. Both probiotics also could reduce 1-3 \log_{10} cfu/cm² population of *E. coli* on mucosa of cecum and $1 \log_{10}$ cfu/g of cecum content. *L. plantarum* 2C12 and *L. acidophilus* 2B4 were effective as probiotics against EPEC on rats.

Key words: probiotic, *Lactobacillus plantarum* 2C12, *Lactobacillus acidophilus* 2B4, Enteropathogenic *Escherichia coli*

PENDAHULUAN

Probiotik didefinisikan sebagai mikroorganisme hidup yang dikonsumsi oleh manusia atau hewan dalam jumlah yang cukup, mampu hidup dan melewati kondisi lambung dan saluran pencernaan serta bermanfaat bagi sel inangnya dengan jalan meningkatkan kesehatan bagi inangnya (Savadogo *et al.*, 2006; FAO/WHO, 2002). Bakteri probiotik juga harus termasuk kelompok aman atau GRAS (Generally Recognized as Safe). *Lactobacillus plantarum* dan *Lactobacillus acidophilus* termasuk spesies bakteri yang tergolong dalam probiotik (Salminen & Wright, 2004).

Working group yang dibentuk oleh FAO/WHO menetapkan secara detil panduan dan kriteria rekomendasi serta metodologi yang digunakan untuk evaluasi probiotik, mengidentifikasi serta menentukan data yang dibutuhkan untuk mengklaim kesehatan probiotik. Kriteria pertama yang harus dipenuhi adalah bahwa isolat yang didapat harus diidentifikasi, baik secara fenotipik, maupun genotipik, mulai dari genus sampai spesies, bahkan sampai tingkatan sub spesies. Kriteria selanjutnya adalah karakterisasi fungsional, baik secara *in vitro* maupun studi hewan, kemudian dilanjutkan dengan pengujian keamanan secara *in vitro* dan *in vivo* serta studi fase satu di manusia (FAO/WHO 2002). Bakteri dapat dinyatakan sebagai probiotik jika dapat bertahan melewati lambung dan usus halus, sehingga probiotik harus toleran terhadap suasana asam dan adanya asam empedu (Tuomola *et al.*, 2001; Bourlioux *et al.*, 2003; Sunny-Roberts & Knoop, 2008).

Lactobacillus spp. dan bakteri asam laktat lainnya yang mempunyai sifat probiotik dapat ditemukan dari sumber pangan hewani. Erkilli & Petaja (2000) melaku-

*Korespondensi:
Departemen Ilmu Produksi dan Teknologi Peternakan,
Fakultas Peternakan, Institut Pertanian Bogor
Jln. Agatis, Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680
E-mail: irma_isnafia@yahoo.com

kan isolasi bakteri asam laktat dari sosis fermentasi dan mengujinya sebagai probiotik. Tamang *et al.* (2008) menemukan *Lactobacillus* probiotik dari bambu fermentasi dan Moulay *et al.* (2006) meneliti bakteri asam laktat probiotik yang diisolasi dari susu. Arief *et al.* (2008) juga mengisolasi *L. plantarum* 1B1 dari daging sapi serta mengaplikasikannya sebagai kultur starter sosis fermentasi.

Probiotik mempunyai berbagai fungsi kesehatan antara lain sebagai pencegah dan mempunyai efek terapeutik melawan diare, mengurangi kejadian *lactose intolerance*, melindungi dari inflamasi/arthritis, mencegah hipertensi dan kanker serta meningkatkan sistem imun tubuh (Parvez *et al.*, 2006). Probiotik juga berfungsi untuk menyempurnakan proses pencernaan manusia dengan cara melindungi saluran pencernaan dari serangan bakteri patogen (Agostoni *et al.*, 2004). Probiotik juga dilaporkan mampu mengatasi kejadian diare yang disebabkan oleh infeksi *Escherichia coli*, baik *E. coli* enteroksigenik/EPEC (Oyetayo, 2004) maupun *E. coli* enterohemoragi /EHEC (Medellin-Pena & Griffiths, 2009).

E. coli enteropatogenik (EPEC) merupakan salah satu strain dari *E. coli* yang menyebabkan diare jika dikonsumsi pada dosis 10^5 - 10^{10} cfu/ml (Kelleher *et al.*, 2002). EPEC melekat pada permukaan mukosa usus dan menyebabkan terjadinya perubahan struktur sel. Selanjutnya, EPEC melakukan invasi menembus sel mukosa sehingga menyebabkan terjadinya iritasi dan diare akut. EPEC dilaporkan sering menginfeksi anak-anak. Pencegahan diare yang disebabkan oleh EPEC sangat penting dilakukan karena diare akut dapat menyebabkan kematian (Nitisinprasert *et al.*, 2006).

Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi efektivitas strain probiotik *L. plantarum* 2C12 dan *L. acidophilus* 2B4 melawan *E. coli* enteropatogenik penyebab diare pada tikus percobaan.

MATERI DAN METODE

Persiapan Kultur Bakteri

Bakteri asam laktat probiotik indigenus *L. plantarum* 2C12 dan *L. acidophilus* 2B4 diisolasi dari daging sapi Peranakan Ongole bagian *topside* dari pasar tradisional di daerah Bogor. Bakteri tersebut selanjutnya diidentifikasi secara biokimiawi berdasarkan pola fermentasi gula dan diidentifikasi secara molekuler dengan menggunakan teknik sekuensing gen 16S rRNA. Kedua kultur tersebut bersifat tahan terhadap pH rendah dan garam empedu. Kultur tersebut disimpan dalam bentuk liofil (*freeze dried*) pada suhu -10°C . Kultur disegarkan pada media *de Man Rogosa Sharp Agar* (MRSA, Oxoid) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam sebagai kultur induk, yang selanjutnya dibiakkan kembali dengan cara yang sama sebagai kultur kerja. Kultur kerja kemudian dihitung populasinya sampai mencapai minimal 10^9 cfu/ml. Kultur kerja pada media MRSA kemudian diencerkan pada media NaCl fisiologis 0,85% hingga mencapai populasi 10^8 cfu/ml yang selanjutnya siap untuk dicekokkan ke tikus percobaan.

Bakteri EPEC yang digunakan dalam penelitian ini merupakan EPEC koleksi Fakultas Kedokteran Hewan IPB yang diisolasi dari feses bayi yang terkena diare. Bakteri EPEC disegarkan dengan cara ditumbuhkan pada media *eosin methylene blue agar* (EMBA, Merck) selama 48 jam yang selanjutnya disimpan pada suhu 4°C sebagai kultur induk. Selanjutnya, EPEC ditumbuhkan pada media *nutrient broth* (NB, Difco) selama 24 jam inkubasi pada suhu 37°C hingga mencapai populasi 10^8 cfu/ml, sebagai kultur kerja. EPEC yang dicekokkan ke tikus percobaan disiapkan dengan cara mengencerkan kultur kerja pada media NaCl fisiologis 0,85% hingga mencapai 10^6 cfu/ml.

Pengelolaan Hewan Percobaan

Hewan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih *albino norway rats* (*Rattus norvegicus*) galur *sprague dawley* umur 5-6 minggu berjenis kelamin jantan hasil pengembangbiakan dari Badan POM RI, dengan bobot badan awal berkisar 120–130 g. Kandang yang digunakan adalah kandang individu yang berukuran 17,5 x 23,75 x 17,5 cm, dengan sekam steril sebagai alas kandang. Suhu ruangan diatur pada 22 - 24°C (Muchtadi 1993) dengan kelembaban udara 60%–70%.

Ransum diberikan sebanyak 20 g per ekor per hari setiap pukul 06.00-07.00 WIB. Air minum diberikan *ad libitum*. Sisa ransum dikumpulkan tiap hari untuk ditimbang sehingga diketahui konsumsi ransum per ekor tikus per hari. Setiap 3 hari dilakukan penimbangan bobot badan per tikus, pencucian kandang, dan penggantian sekam.

Komposisi ransum basal disusun berdasarkan standar AOAC (2005) dengan kasein (standar protein ransum 10%), minyak jagung sebagai sumber lemak, campuran mineral, *carboxy methyl cellulose* (CMC) sebagai sumber serat, dan vitamin mix yang terdiri atas vitamin A, B1, B2, B3, B6, B12, C, D3, E dan Ca-pantotemat serta pati jagung. Air minum yang digunakan adalah air minum kemasan.

Perlakuan Anti-*E.coli* Enteropatogenik (EPEC) Secara *in Vivo*

Pengujian ini dilakukan sesuai petunjuk Zoumpoulou *et al.* (2008). Dua jenis kultur bakteri asam laktat probiotik indigenus *L. plantarum* 2C12 dan *L. acidophilus* 2B4 berumur 24 jam diencerkan pada media NaCl fisiologis 0,85% dengan populasi 10^8 cfu/ml. Selanjutnya probiotik diberikan sesuai dengan perlakuan (Tabel 1) kepada tikus percobaan sebanyak 1 ml per ekor tikus per hari. Populasi EPEC penyebab diare yang diberikan adalah sebesar 10^6 cfu/ml sebanyak 1 ml per ekor tikus percobaan per hari berdasarkan pada dosis infeksi EPEC yang dapat menyebabkan diare, yaitu minimal 10^5 cfu/ml (Oyetayo, 2004). Pemberian probiotik dan EPEC dilakukan dengan cara dicekok menggunakan sonde. Tikus dibagi menjadi 6 perlakuan (Tabel 1), dengan jumlah tikus setiap perlakuan sebanyak 16 ekor.

Adaptasi tikus terhadap lingkungan selama 7 hari dilakukan pada awal penelitian dengan pemberian

Tabel 1. Perlakuan pemberian probiotik dan *E. coli* enteropatogenik (EPEC)

Perlakuan	Pemberian jenis probiotik (hari ke-1 sampai ke-21)	Jadwal pemberian EPEC
A	-	-
B	<i>L. plantarum</i> 2C12	-
C	<i>L. acidophilus</i> 2B4	-
D	<i>L. plantarum</i> 2C12	Hari ke-7 sampai ke-13
E	<i>L. acidophilus</i> 2B4	Hari ke-7 sampai ke-14
F	-	Hari ke-7 sampai ke-14

Keterangan: - artinya tidak diberikan

pakan ransum basal terhadap semua tikus. Pembedahan tikus dilakukan pada hari ke-7 (minggu 1), 14 (minggu 2) dan 21 (minggu 3) dengan 4 ulangan per kelompok tikus. Peubah yang dianalisa adalah populasi BAL serta *E. coli* di mukosa dan isi sekum. Analisis kadar air feses dan pengamatan kondisi kesehatan tikus secara visual juga dilakukan untuk mengetahui kondisi diare yang terjadi pada tikus.

Pengukuran Total BAL dan *E. coli* Saluran Pencernaan

Setiap ekor tikus dibedah menggunakan metode *cervicalis dislocalis* lalu diambil usus bagian sekum serta isi sekum. Permukaan usus bagian dalam sekum dikerik mukosanya pada ukuran luasan 1 x 1 cm, dengan menggunakan spatula steril dan dimasukkan ke dalam larutan pengencer *buffer phosphate water* (BPW) untuk selanjutnya dilakukan pengenceran yang sesuai dan pengujian total BAL dan total *E. coli* pada media yang sesuai. Isi sekum diambil sebanyak 5 g secara aseptis untuk dilakukan pengenceran dan pengujian total BAL dan *E. coli*. Metode yang digunakan untuk menghitung populasi BAL dan *E. coli*, baik pada mukosa sekum maupun pada isi sekum, adalah metode BAM (bacteriological analytical methods) (2002), dengan media pertumbuhan MRSA (Oxoid) untuk total BAL dan EMBA (Merck) untuk *E. coli*.

Rancangan Percobaan dan Analisis Data

Data populasi bakteri yang diperoleh ditransformasi dalam bentuk logaritma untuk selanjutnya dianalisa statistik. Data populasi bakteri dianalisa statistik dengan menggunakan rancangan acak lengkap pola faktorial, dengan metode ANOVA, dan jika perlakuan berpengaruh nyata dilakukan uji beda nyata terkecil (Steel & Torrie, 1995). Faktor yang diberikan adalah pemberian probiotik yang berbeda pada tiap perlakuan tikus dan perbedaan waktu (minggu) yang dijadikan sebagai faktor perlakuan karena pemberian EPEC yang berbeda (Tabel 1). Data konsumsi ransum, pertambahan bobot badan (PBB), dan efisiensi ransum dianalisa dengan menggunakan rancangan acak lengkap dengan 6 perlakuan pemberian probiotik. Jika perlakuan menunjukkan pengaruh yang nyata maka dilanjutkan dengan

uji Duncan. Pengamatan minggu sebagai periode pemeliharaan tidak dimasukkan sebagai perlakuan untuk analisis data seperti halnya pada data populasi bakteri karena pengambilan data bobot badan (penimbangan bobot badan) dilakukan setiap 3 hari dan penimbangan ransum dilakukan setiap hari.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Performa Tikus Percobaan

Kejadian diare pada tikus yang dipapar EPEC muncul pada minggu kedua pemeliharaan. Tikus yang dipapar EPEC tanpa perlakuan probiotik (F) mengalami sakit diare. Nilai kadar air feses tikus F pada minggu kedua pemeliharaan adalah 63,95% yang lebih tinggi daripada tikus lainnya (A, B, C, D, dan E), yaitu berkisar 46,63%–52,07%. Demikian juga halnya dengan kadar air feses pada minggu ketiga pemeliharaan, tikus F mengalami diare yang parah yang ditunjukkan dengan feses yang cair dengan kadar air 68,92% dan kondisi tubuh yang tidak aktif bergerak. Selain itu, bagian anus tikus F mengalami peradangan dan iritasi. Lain halnya dengan tikus yang dipapar EPEC namun diberikan probiotik (D dan E), walaupun tergolong sakit dan bobot badannya mengalami penurunan karena konsumsi pakan yang menurun akibat infeksi EPEC, namun diare yang ditimbulkan tidak parah (ringan), dan juga bagian anus tidak mengalami peradangan ataupun iritasi. Hal ini dibuktikan dengan kadar air feses pada minggu kedua pemeliharaan, yaitu sebesar 46,63% dan 48,22%, dan juga pada minggu ketiga, yaitu sebesar 53,37% dan 57,75%, yang jauh dibawah nilai kadar air feses tikus F. Selain itu, tikus D dan E juga masih bergerak cukup aktif walaupun tidak seaktif kelompok tikus A, B, dan C.

Performa tikus percobaan ditunjukkan dengan konsumsi ransum, PBB per ekor per hari serta efisiensi ransum (Tabel 2). Konsumsi ransum pada tikus dengan perlakuan pemberian probiotik *L. plantarum* (B) dan *L. acidophilus* (C) nyata lebih tinggi ($P<0,05$) dibandingkan dengan tikus sakit yang dipapar EPEC. Tikus sakit yang dipapar EPEC dan juga diberikan perlakuan probiotik, yaitu tikus D dan E mempunyai tingkat konsumsi ransum yang lebih tinggi ($P<0,05$) dibandingkan dengan tikus tanpa pemberian probiotik (F) (Tabel 2). Kondisi ini menunjukkan bahwa pemberian probiotik mampu memperbaiki konsumsi ransum pada tikus yang sakit yang dipapar EPEC.

Demikian juga halnya dengan PBB tikus, pada tikus sehat (A, B, C) nyata lebih tinggi dibandingkan dengan tikus sakit (D, E, F) (Gambar 1). Namun demikian, PBB pada tikus sakit diare karena dipapar EPEC dengan pemberian probiotik *L. plantarum* maupun *L. acidophilus* (tikus D, E) sangat nyata lebih tinggi ($P<0,01$) dibandingkan dengan tikus sakit diare dipapar EPEC tanpa pemberian probiotik (F). Hal ini sejalan dengan nilai konsumsi ransum pada tikus D dan E yang lebih tinggi dibandingkan dengan tikus F.

Nilai efisiensi ransum menunjukkan bahwa tikus sehat A, B, C mempunyai nilai yang lebih tinggi ($P<0,05$) dibandingkan dengan tikus sakit diare D, E, F (Tabel 2). Hal ini disebabkan oleh rendahnya konsumsi ransum

Tabel 2. Konsumsi ransum, pertambahan bobot badan, dan efisiensi ransum tikus percobaan yang diberi probiotik *L. plantarum* 2C12 dan *L. acidophilus* 2B4

	Perlakuan					
	A	B	C	D	E	F
Konsumsi ransum (g/ekor/hari)	17,32±1,82 ^a	18,27±1,31 ^a	17,06±1,98 ^a	15,43±2,47 ^b	15,60±2,32 ^b	13,88±3,34 ^c
Pertambahan bobot badan (g/ekor/hari)	5,20±0,59 ^A	5,31±0,53 ^A	4,76±0,42 ^A	2,48±0,35 ^B	2,04±0,31 ^B	1,72±0,24 ^C
Efisiensi ransum (%)	30,02±0,32 ^a	29,06±0,41 ^a	27,9±0,21 ^b	16,07±0,14 ^c	13,08±0,13 ^d	12,39±0,07 ^d

Keterangan: superskrip huruf kecil berbeda pada baris yang sama menunjukkan berbeda nyata ($P < 0,05$), superskrip huruf kapital berbeda pada baris yang sama menunjukkan berbeda sangat nyata ($P < 0,01$). A= kontrol negatif (tanpa probiotik/tanpa *E. coli* enteropatogenik (EPEC)), B= pemberian *L. plantarum*, C= pemberian *L. acidophilus*, D= dipapar EPEC dan pemberian *L. plantarum*, E= dipapar EPEC dan pemberian *L. acidophilus*, F= kontrol positif (dipapar EPEC).

dan juga PBB yang menurun pada tikus sakit diare (Gambar 1). Nilai efisiensi ransum terendah dimiliki oleh tikus sakit E dan F.

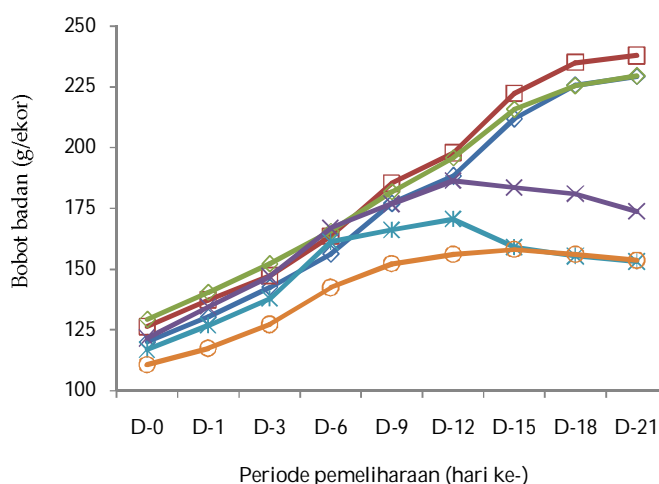
L. plantarum 2C12 dan *L. acidophilus* 2B4 mampu memperbaiki konsumsi ransum dan PBB tikus percobaan disebabkan oleh beberapa faktor, diantaranya mampu meningkatkan absorpsi nutrisi dengan memproduksi beberapa enzim pencernaan, misalnya enzim proteolitik. Selain itu, probiotik juga mampu melepaskan sejumlah asam amino bebas dan mensintesis vitamin yang sangat dibutuhkan oleh pertumbuhan inangnya (Parvez *et al.*, 2006). Hal ini didukung oleh penelitian Oyetayo (2004) yang melaporkan bahwa probiotik *L. acidophilus* mampu meningkatkan bobot badan dan konsumsi ransum pada tikus yang dipapar *E. coli* enterotoksigenik. Gross *et al.* (2008) juga melaporkan bahwa pemberian probiotik *L. plantarum* 299v mampu memperbaiki konsumsi ransum dan bobot badan tikus percobaan.

Total BAL Mukosa Sekum dan Isi Sekum

Total BAL mukosa sekum. Total BAL pada mukosa sekum menggambarkan jumlah BAL yang menempel

pada mukosa sekum (Tabel 3). Kemampuan menempel BAL pada usus merupakan syarat penting yang harus dipenuhi oleh probiotik (FAO/WHO, 2002).

Berdasarkan Tabel 3, total BAL yang menempel pada mukosa sekum tikus sehat maupun tikus sakit yang diberikan probiotik (B, C, D, E) sangat nyata lebih tinggi sebanyak $1 \log_{10}$ cfu/cm² ($P < 0,01$) daripada kelompok kontrol sehat (A) dan tikus kontrol sakit tanpa diberikan probiotik (F). Populasi BAL pada mukosa sekum tikus yang diberi probiotik (B, C, D, E) mencapai kisaran 6,31–6,52 \log_{10} cfu/cm², sedangkan pada tikus kontrol negatif (A) dan kontrol positif (F) hanya mencapai 5,59–5,72 \log_{10} cfu/cm². Kondisi ini menunjukkan bahwa *L. plantarum* 2C12 dan *L. acidophilus* 2B4 mampu melewati berbagai hambatan di saluran pencernaan, diantaranya pH rendah (di lambung) dan adanya garam empedu di usus sehingga sampai di usus halus bagian sekum dan menempel pada mukosa sekum. Gross *et al.* (2008) juga melaporkan bahwa populasi *Lactobacillus* spp. di usus halus tikus percobaan dengan pemberian probiotik *L. plantarum* 299v lebih tinggi (10^6 cfu/g) daripada kontrol (10^5 cfu/g). Hal ini membuktikan bahwa *L. plantarum* mampu beradaptasi dan hidup di saluran pencernaan.



Gambar 1. Bobot badan tikus percobaan yang diberi probiotik *L. plantarum* 2C12 dan *L. acidophilus* 2B4. (◇) : grup kontrol negatif; (■) : grup *L. plantarum* 2C12; (●) : grup *L. acidophilus* 2B4; (×) : *L. plantarum* 2C12 + EPEC; (*) : *L. acidophilus* 2B4 + EPEC; (○) : kontrol positif.

Tabel 3. Total BAL mukosa sekum tikus (\log_{10} cfu/cm²) yang diberi probiotik *L. plantarum* 2C12 dan *L. acidophilus* 2B4

Minggu	Perlakuan						Rata-rata
	A	B	C	D	E	F	
1	5,15±0,66	6,64±0,77	6,34±0,33	6,60±0,19	6,69±0,20	5,84±0,29	6,21±0,70 ^A
2	5,56±0,50	6,08±0,92	5,90±0,41	5,98±0,55	5,88±0,62	5,23±0,67	5,77±0,63 ^B
3	6,06±0,28	6,66±0,47	6,69±0,35	6,90±0,36	6,98±0,44	6,10±0,38	6,56±0,50 ^A
Rata-rata	5,59±0,60 ^B	6,46±0,73 ^A	6,31±0,47 ^A	6,49±0,53 ^A	6,52±0,64 ^A	5,72±0,57 ^B	

Keterangan: superskrip huruf kapital berbeda pada baris atau kolom yang sama menunjukkan berbeda sangat nyata ($P<0,01$). A= kontrol negatif (tanpa probiotik/tanpa *E. coli* enteropatogenik (EPEC)), B= pemberian *L. plantarum*, C= pemberian *L. acidophilus*, D= dipapar EPEC dan pemberian *L. plantarum*, E= dipapar EPEC dan pemberian *L. acidophilus*, F= kontrol positif (dipapar EPEC).

Adlerberth *et al.* (2000) menyatakan bahwa *Lactobacillus* spp. menghasilkan senyawa adhesin sehingga mampu menempel pada mukosa usus.

Total BAL pada minggu kedua saat diberikan EPEC, lebih rendah sebesar $1 \log_{10}$ cfu/cm² ($P<0,01$) dibandingkan dengan minggu sebelum dan sesudah diberikan paparan EPEC. Hal ini terjadi karena pada saat terjadinya pemberian EPEC, maka jumlah EPEC pada saluran pencernaan tikus meningkat dan juga terjadi kompetisi populasi mikroflora sehingga total BAL menurun.

Total BAL isi sekum. Komposisi mikroflora isi sekum menggambarkan komposisi mikroorganisme yang terdapat pada isi makanan yang telah dicerna di usus halus yang akan menjadi feses. Sekum pada tikus merupakan tempat berlangsungnya fermentasi zat-zat makanan oleh mikroflora usus seperti halnya kolon pada usus manusia (Liong & Shah, 2006). Total BAL isi sekum menggambarkan total BAL yang ada di feses (Tabel 4).

Total BAL pada isi sekum pada tikus sehat (B, C) dan tikus sakit yang diberikan probiotik *L. plantarum* (D) sangat nyata lebih tinggi ($P<0,01$) dibandingkan dengan tikus sakit tanpa diberikan probiotik (F). Tikus sehat A mempunyai total BAL isi sekum yang tidak berbeda dengan tikus sakit dengan diberikan probiotik *L. acidophilus* (E) dan tanpa pemberian probiotik (F). Hal ini menunjukkan bahwa *L. plantarum* 2C12 lebih efektif meningkatkan total BAL isi sekum pada tikus yang dipapar EPEC dibandingkan dengan *L. acidophilus* 2B4. Perbedaan tersebut kemungkinan karena *L. plantarum*

memproduksi senyawa adhesin manosa pada dinding selnya yang dapat menempel pada mukosa usus lebih baik dibandingkan dengan spesies *Lactobacillus* lainnya (Gross *et al.*, 2008), sehingga *L. plantarum* mampu berkembang biak dengan baik di saluran pencernaan yang menyebabkan total BAL di usus termasuk di isi sekum meningkat.

Total *E. coli* Mukosa Sekum dan Isi Sekum

Total *E. coli* mukosa sekum. EPEC dapat menginfeksi usus halus dan menyebabkan terjadinya iritasi pada mukosa usus. Terdapat perubahan populasi *E. coli* pada mukosa sekum pada kelompok tikus yang dipapar oleh EPEC (D, E, F) (Tabel 5).

Total *E. coli* mukosa sekum pada minggu kedua saat tikus sakit dipapar oleh EPEC pada tikus yang diberi probiotik *L. plantarum* 2C12 dan *L. acidophilus* 2B4, baik pada tikus sehat (B, C) maupun pada tikus sakit (D, E), nyata lebih rendah ($P<0,05$) daripada tikus sakit dipapar EPEC (F) maupun tikus sehat kontrol negatif (A). Pemberian probiotik *L. plantarum* 2C12 dan *L. acidophilus* 2B4 (D, E) mampu menurunkan total *E. coli* pada mukosa sekum sebesar $1 \log_{10}$ cfu/cm² dibandingkan dengan tikus yang dipapar EPEC tanpa diberikan probiotik (F). Secara keseluruhan baik pada minggu ke-1, 2, dan 3, kondisi *E. coli* pada mukosa sekum pada tikus yang diberikan probiotik (B, C, D, E) nyata lebih rendah daripada tikus kontrol positif (F). Hal ini menunjukkan bahwa *L. plantarum* 2C12 dan *L. acidophilus* 2B4 mampu menghambat populasi *E. coli* pada mukosa sekum.

Tabel 4. Total BAL isi sekum (\log_{10} cfu/g) yang diberi probiotik *L. plantarum* 2C12 dan *L. acidophilus* 2B4

Minggu	Perlakuan						Rata-rata
	A	B	C	D	E	F	
1	8,73±0,21	8,97±0,16	8,93±0,27	8,98±0,54	8,64±0,63	8,18±0,65	8,74±0,50
2	8,63±0,44	8,92±0,33	8,95±0,51	9,08±0,36	8,67±0,38	8,20±0,46	8,74±0,48
3	8,49±0,09	8,67±0,49	8,79±0,49	9,00±0,59	8,79±0,37	7,88±0,34	8,60±0,53
Rata-rata	8,61±0,28 ^{AB}	8,85±0,35 ^A	8,89±0,40 ^A	9,02±0,46 ^A	8,70±0,44 ^{AB}	8,08±0,48 ^B	

Keterangan: superskrip huruf kapital berbeda pada baris yang sama menunjukkan berbeda sangat nyata ($P<0,01$). A= kontrol negatif (tanpa probiotik/tanpa *E. coli* enteropatogenik (EPEC)), B= pemberian *L. plantarum*, C= pemberian *L. acidophilus*, D= dipapar EPEC dan pemberian *L. plantarum*, E= dipapar EPEC dan pemberian *L. acidophilus*, F= kontrol positif (dipapar EPEC).

Tabel 5. Total *E. coli* mukosa sekum tikus (\log_{10} cfu/cm²) yang diberi probiotik *L. plantarum* 2C12 dan *L. acidophilus* 2B4

Minggu	Perlakuan					
	A	B	C	D	E	F
1	5,12±0,51 ^{abc}	4,66±0,33 ^{bcd}	4,80±0,12 ^{bcd}	4,25±0,81 ^{bcd}	4,22±0,30 ^{bcd}	5,42±0,25 ^{ab}
2	4,80±0,89 ^{bcd}	3,11±0,95 ^d	2,95±0,93 ^d	4,81±0,69 ^{cd}	3,02±1,25 ^d	5,32±1,09 ^{ab}
3	5,07±0,38 ^{bc}	4,70±0,62 ^{bcd}	3,35±1,00 ^{cd}	5,62±0,85 ^b	5,09±0,42 ^{bc}	6,23±0,28 ^a

Keterangan: superskrip huruf kecil yang berbeda pada baris dan kolom yang sama menunjukkan berbeda nyata ($P<0,05$). A= kontrol negatif (tanpa probiotik/tanpa *E. coli* enteropatogenik (EPEC)), B= pemberian *L. plantarum*, C= pemberian *L. acidophilus*, D= dipapar EPEC dan pemberian *L. plantarum*, E= dipapar EPEC dan pemberian *L. acidophilus*, F= kontrol positif (dipapar EPEC).

Medellin-Pena & Griffiths (2009) juga melaporkan bahwa probiotik mampu menghambat kolonisasi *E. coli* enterohemorragic (EHEC) pada usus tikus percobaan.

L. plantarum dan *L. acidophilus* menghasilkan senyawa antimikroba yang bersifat bakterisidal yang mampu menghambat pertumbuhan *E. coli*. *L. acidophilus* menghasilkan senyawa asam organik terutama asam laktat sebagai hasil metabolismenya yang bersifat antimikroba terhadap *E. coli* (Reque et al., 2000). Selain memproduksi asam organik terutama asam laktat, *L. plantarum* A-1 menghasilkan senyawa bakteriosin yang disebut dengan plantaricin ASM-1 yang mampu menghambat pertumbuhan *E. coli* (Hata et al., 2010). Bakteriosin mampu menghambat pertumbuhan mikroba lainnya dengan cara membentuk rongga atau pori di dinding/membran sel yang sensitif dan menurunkan potensial dan atau gradien pH yang menyebabkan rusaknya material seluler hingga menyebabkan sel lisis (Asaduzzaman & Sonomoto, 2009).

Total *E. coli* isi sekum. Kejadian diare juga ditunjukkan dengan tingginya populasi *E. coli* pada isi sekum. Diare akan terjadi pada populasi yang lebih tinggi daripada $8,5 \log_{10}$ cfu/g feses (Medellin-Pena & Griffiths, 2009). Kejadian diare muncul pada minggu kedua dan berlangsung sampai pada minggu ketiga pada tikus yang dipapar EPEC tanpa pemberian probiotik (F) dengan populasi *E. coli* mencapai $8 \log_{10}$ cfu/g, namun dengan adanya pemberian probiotik *L. plantarum* 2C12 dan *L. acidophilus* 2B4 (D, E) maka populasi *E. coli* isi sekum dapat ditekan pada populasi $7 \log_{10}$ cfu/g, sehingga tidak terjadi diare walaupun dipapar EPEC (Tabel 6).

Pemberian probiotik *L. plantarum* 2C12 dan *L. acidophilus* 2B4 mampu menurunkan total *E. coli* pada isi sekum hingga minggu ketiga (Tabel 6). Saat tikus dipapar EPEC (tikus D, E, F) pada minggu kedua, total *E. coli* isi sekum pada tikus yang diberikan probiotik *L. plantarum* 2C12 dan *L. acidophilus* 2B4 (D dan E) nyata lebih rendah sebesar $1 \log_{10}$ cfu/g ($P<0,05$) dibandingkan dengan tikus kontrol positif (F). Demikian juga halnya dengan tikus sehat yang diberikan probiotik *L. plantarum* 2C12 dan *L. acidophilus* 2B4 (B, C) juga mempunyai total *E. coli* isi sekum lebih rendah $1 \log_{10}$ cfu/g ($P<0,05$) dibandingkan dengan tikus kontrol negatif (A). *L. plantarum* 2C12 dan *L. acidophilus* 2B4 mampu menurunkan jumlah *E. coli* pada isi sekum sebesar $1 \log_{10}$ cfu/g dan mampu mencegah terjadinya diare setelah dipapar EPEC.

Total *E. coli* yang dihitung pada penelitian ini merupakan total *E. coli* fekal, yang tidak secara khusus menghitung populasi EPEC. Walaupun pada tikus A (kontrol negatif) total *E. coli* baik pada minggu 1, 2, dan 3 cukup tinggi ($8,28-8,89 \log$ cfu/g) dan tidak berbeda dengan tikus F (kontrol positif), namun tikus A tidak mengalami diare sedangkan kelompok tikus F mengalami diare parah. Hal ini disebabkan oleh strain *E. coli* yang berada di saluran pencernaan tikus A dan F yang berbeda. *E. coli* merupakan bakteri yang sebagian strainnya bersifat patogen namun sebagian yang lain bersifat nonpatogen. *E. coli* nonpatogen merupakan mikroflora normal saluran pencernaan terutama di sekum dan kolon, dan tidak menyebabkan kejadian diare. Kemungkinan besar total *E. coli* yang terhitung pada tikus F adalah gabungan antara *E. coli* nonpatogenik dan EPEC yang sengaja diinfeksi pada penelitian ini, sedangkan total *E. coli* yang dihitung pada tikus A merupakan *E. coli* nonpa-

Tabel 6. Total *E. coli* isi sekum tikus (\log_{10} cfu/g) yang diberi probiotik *L. plantarum* 2C12 dan *L. acidophilus* 2B4

Minggu	Perlakuan					
	A	B	C	D	E	F
1	8,34±0,65 ^{ab}	8,07±0,12 ^{abc}	8,08±0,21 ^{abc}	7,72±0,91 ^{bcd}	7,54±0,10 ^{bcd}	8,25±0,67 ^{ab}
2	8,28±1,00 ^{ab}	7,01±0,77 ^{cd}	6,30±0,91 ^d	7,86±0,56 ^{bcd}	6,72±0,99 ^{cd}	8,60±0,13 ^a
3	8,89±0,35 ^a	7,99±0,03 ^{bcd}	7,26±0,91 ^{bcd}	7,90±0,57 ^{bcd}	7,97±0,07 ^{bcd}	8,96±0,51 ^a

Keterangan: superskrip huruf kapital berbeda pada baris atau kolom yang sama menunjukkan berbeda sangat nyata ($P<0,01$). A= kontrol negatif (tanpa probiotik/tanpa *E. coli* enteropatogenik (EPEC)), B= pemberian *L. plantarum*, C= pemberian *L. acidophilus*, D= dipapar EPEC dan pemberian *L. plantarum*, E= dipapar EPEC dan pemberian *L. acidophilus*, F= kontrol positif (dipapar EPEC).

togen. Hal inilah yang menyebabkan walaupun total *E. coli* yang dihitung pada isi sekum tikus A tidak berbeda dengan tikus F, namun dampak yang diakibatkannya sangat berbeda yaitu tikus A tidak mengalami diare namun tikus F mengalami diare parah.

KESIMPULAN

Pemberian probiotik *L. plantarum* 2C12 dan *L. acidophilus* 2B4 mampu meningkatkan konsumsi ransum, pertambahan bobot badan, dan efisiensi ransum pada tikus yang dipapar EPEC dibandingkan dengan tikus tanpa pemberian probiotik. Kedua galur probiotik tersebut juga terbukti efektif mencegah diare yang disebabkan oleh EPEC dengan jalan meningkatkan total bakteri asam laktat di mukosa dan isi sekum, serta menurunkan total *E. coli* pada mukosa dan isi sekum.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada DP2M Ditjen DIKTI, Kementerian Pendidikan Nasional yang telah memberikan dana untuk penelitian ini melalui Penelitian Hibah Bersaing tahun 2009.

DAFTAR PUSTAKA

- AOAC (Association of Official Analytical Chemist). 2005. Official Methods of Analysis. Washington, DC.
- Adlerberth, I., M. Cerquetti, I. Poilane, A. Wold, & A. Collignon. 2000. Mechanisms of colonization and colonization resistance of the digestive tract. Part 1: bacteria/host interactions. *Microb. Ecol. Health Dis.* 2: 223-239.
- Agostoni, C., I. Axelsson, C. Braegger, O. Goulet, B. Koletzko, K. F. Michaelsen, J. Rigo, R. Shamir, H. Szajewska, D. Turck, & L. T. Weaver. 2004. Probiotic bacteria in dietetic products for infants : a commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition. *J. Pediatr Gastroenterol. Nutr.* 28: 365-374.
- Arief, I. I., R. R. A. Maheswari, T. Suryati, Komariah, & S. Rahayu. 2008. Kualitas mikrobiologi sosis fermentasi daging sapi dan domba yang menggunakan kultur kering *Lactobacillus plantarum* 1B1 dengan umur yang berbeda. *Med. Pet.* 31: 36-43.
- Asaduzzaman, S. M. & K. Sonomoto. 2009. Lantibiotics: Diverse activities and unique modes of action. *J. Biosci. & Bioeng.* 107: 475-487.
- BAM (Bacteriological Analytical Methods) Online. 2001. <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam.html>. [7 Agustus 2009]
- Bourlioux, P., B. Koletzko, F. Guarner, & V. Braesco. 2003. The intestine and its microflora are partners for the protection of the host: report on the Danone symposium 'The Intelligent Intestine', held in Paris, June 14, 2002. *Am. J. Clin. Nutr.* 78: 675-683.
- Erkilla S. & E. Petaja. 2000. Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use. *Meat Sci.* 55: 297-300.
- FAO/WHO. 2002. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Report of Joint FAO/WHO Working Group on drafting Guidelines for the evaluation of probiotics in food. London Ontario, Canada.
- Gross, G. J. Wildner, A. Schoneville, J. L. W. Rademaker, R. vander Meer, & J. Snel. 2008. Probiotic *Lactobacillus plantarum* 299v doesnot unfavorable phytohematoglutinin induced changes in the rat intestinal microbiota. *Appl. Environ. Microbiol* 74: 5224-5249.
- Hata, T., R. Tanaka, & S. Ohmomo. 2010. Isolation and characterization of plantaricin ASM 1: a new bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* A-1. *International J. Food Microbiol.* 137:94-99.
- Kelleher, S. I. Casas, N. Carbaja, & B. Lonnedal. 2002. Supplementation of infant formula with the probiotic *Lactobacillus reuteri* and zinc : impact on enteric infection nutrition in infant rhesus monkeys. *J. Pediatr Gastroenterol. Nutr.* 35 : 162-168.
- Liong, M. T. & N. P. Shah. 2006. Effects of a *Lactobacillus casei* synbiotic on serum lipoprotein, intestinal microflora and organic acids in rats. *J. Dairy Sci.* 89:1390-1399.
- Medellin-Pena, M. J. & M. W. Griffiths. 2009. Effects of molecules secreted by *Lactobacillus acidophilus* strain La-5 on *Escherichia coli* O157:H7 Colonization. *Appl. Environ. Microbiol* 75: 1165-1172.
- Moulay, M., H. Aggad, Z. Benmechernene, B. Guessas, & M. Kihal. 2006. Cultivable lactic acid bacteria isolated from Algerian raw goat's milk and their proteolytic activity. *World J. Dairy & Food Sci.* 1: 12-18.
- Muchtadi, D. 1993. Teknik Evaluasi Nilai Gizi Protein. Program Pasca Sarjana. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Nitisinprasert, S., N. Pungsungworn, P. Wanchaitanawong, G. Loiseau, & D. Montet. 2006. In vitro adhesion assay of lactic acid bacteria, *Escherichia coli* and *Salmonella* sp. by microbiological and PCR methods. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 28 (suppl.1): 99-106.
- Oyetayo, V. O. 2004. Performance of rats orogastrically dosed with faecal strains of *Lactobacillus acidophilus* and challenged with *Escherichia coli*. *Afr. J. Biotechnol.* 3: 409-411.
- Parvez, S., K. A. Malik, S. Ah. Kong, & H. Y. Kim. 2006. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. Review article. *J. Appl. Microbiol.* 100: 1171-1185.
- Reque, E. F., A. Pandey, S. G. Franco, & C. R. Soccol. 2000. Isolation, identification and physiological study of *Lactobacillus acidophilus* LPB for use as probiotic in chickens. *Braz. J. Microbiol.* 31: 303-307.
- Salminen, S. & A. V. Wright. 2004. Lactic Acid Bacteria. Microbiology and Functional Aspects. 2nd Edition, Revised and Expanded. Marcell Dekker, Inc., New York.
- Savado, A., C. A. T. Outara, I. H. N. Bassole, & A. S. Traore. 2006. Bacteriocins and lactic acid bacteria – a minireview. *Afr J Biotechnol.* 5: 678-683.
- Steel, R. G. D. & J. H. Torrie. 1995. Principles and Procedures of Statistic. A Biometrical Approach. 2nd Ed. Mc.Graw Hill International Book Co., London.
- Sunny-Roberts, E. O. & D. Knorr. 2008. Evaluation of the response of *Lactobacillus rhamnosus* VTT E-97800 to sucrose-induced osmotic stress. *Food Microbiol.* 25: 183-189.
- Tamang, B., U. Schilinger, C. A. M. P. Franz, M. Gores, & W. H. Holzapfel. 2008. Phenotypic and genotypic identification of lactic acid bacteria isolated from ethnic bamboo tender shoots of North East India. *Int. J. Food Microbiol.* 121: 35-40.
- Tuomola, E., R. Crittenden, M. Playne, E. Isolauri, & S. Salminen. 2001. Quality assurance criteria for probiotic bacteria. *Am. J. Clin. Nutr.* 73 (suppl): 393S-398S.
- Zoumpopoulou, G., B. Foligne, K. Christodoulou, C. Grangette, B. Pot, & E. Tsakalidou. 2008. *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179 displays probiotic potential *in vitro* and protects against trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)-induced colitis and *Salmonella* infection in murine models. *Int. J. Food Microbiol.* 121: 18-19.